



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

**Carboplatin 내성 망막모세포종
세포주의 확립 및 특성 규명 연구**

**Establishment and Characterization of
Carboplatin-Resistant Retinoblastoma
Cell Lines**

2018 년 2 월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학전공

조 창 식

A thesis of the Degree of Doctor of Philosophy

**Establishment and Characterization of
Carboplatin-Resistant Retinoblastoma
Cell Lines**

**Carboplatin 내성 망막모세포종
세포주의 확립 및 특성 규명 연구**

February 2018

**The Department of Biomedical Sciences,
Seoul National University
College of Medicine**

Chang Sik Cho

Carboplatin 내성 망막모세포종 세포주의 확립 및 특성 규명 연구

Establishment and Characterization of Carboplatin-Resistant Retinoblastoma Cell Lines

지도교수 김 정 훈

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2017 년 10 월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

조 창 식

조창식의 의학박사 학위논문을 인준함

2018 년 1 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

Establishment and Characterization of Carboplatin-Resistant Retinoblastoma Cell Lines

by

Chang Sik Cho

A thesis submitted to the Department of
Biomedical Sciences in partial fulfillment of the
requirements for the Degree of Doctor of
Philosophy in Medical Science
at Seoul National University College of Medicine

January 2018

Approved by Thesis Committee:

Professor _____ Chairman
Professor _____ Vice chairman
Professor _____
Professor _____
Professor _____

초 록

서론: 망막모세포종(retinoblastoma)은 어린이에게 발병되는 안구내 악성 종양이다. 국소 치료와 항암화학요법을 사용하여 생존율을 높이고 안구를 보존하고 있다. 항암화학요법은 초기에 높은 효과를 나타낸다. 하지만 항암제에 저항성이 있는 세포로 인해 재발을 하는 경우가 생긴다. 그러한 환자는 다시 항암화학요법의 효과를 얻지 못하고 결국 안구를 적출하게 된다. 이러한 아이들의 안구를 치료하고 보존해 주기 위해 많은 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 항암화학요법에 저항성을 가진 세포를 확립하고 그 특성을 확인하고자 한다.

방법: 망막모세포종 세포주 Y79 및 SNUOT-Rb1에서 항암화학요법에 가장 많이 사용하는 carboplatin의 농도를 단계적으로 높여 처리함으로써 저항성 세포주를 확립했다. Carboplatin에 대한 내성을 확인하기 위해, 세포 생존 분석을 진행하였다. 또 carboplatin을 처리 후 세포에서 DNA 단편화 현상 확인 및 cleaved caspase-3 의 발현 정도를 확인하였다. BALB/c nude 생쥐 안구 안에 종양을 형성시킨 후 carboplatin을 주사하여 변화되는 양상을 확인하였다. 형광 활성 세포 분류기와 western blot을 통해 세포 주기를 확인하였고, 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction)을 통해 약물 유출에 관여하는 유전자의 변화를 확인하였다.

결과: 내성 세포주 Y79/CBP 및 SNUOT-Rb1/CBP를 확립하였다. 실제 세포 생존 분석에서 Y79/CBP 및 SNUOT-Rb1/CBP 세포주가 부모 세포에 비해 carboplatin에 대한 내성이 증가되어 고농도에서도 세포가 살아있음을 확인했다. 세포 사멸 실험인 DNA 단편화 현상 확인 및 cleaved caspase-3의 발현 평가에서도 carboplatin을 고농도로 처리하더라도 세포가 살아있음을 확인했다. 또 부모 세포와 carboplatin 내성 세포를 각각 안구내로 주입하여 종양을 형성시킨 뒤 carboplatin을 다시 안구내로 주사하였다. 종양의 크기를 비교 분석한 결과 내성 세포주가 부모 세포보다 더욱 종양이 잘 형성되는 결과를 확인하였다. 흥미롭게도 내성 세포의 성장속도가 부모세포보다 느리게 자라는 것을 확인하였다. 형광 활성 세포 분류기를 통해 세포 주기를 확인한 결과 G0/G1 세포의 비율이 부모 세포 보다 내성 세포에서 높았다. Western blot을 통해 carboplatin 내성 세포에서 cyclin D1과 cyclin D3의 발현이 감소하고 p18과 p27의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, carboplatin 내성 세포에서 약물 유출과 관련된 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

결론: Carboplatin 내성 세포주 개발은 망막모세포종의 항암화학요법의 저항성 문제를 해결하고자 하는 연구에 활용될 수 있다.

주요어: Retinoblastoma, Chemoresistance, Carboplatin, Cell cycle,

Multidrug resistance

학 번: 2014 - 30669

목 차

초록.....	i
목차.....	iii
그림 목록.....	iv
약어표	vi
서론.....	1
실험 재료 및 방법	4
결과.....	12
고찰.....	40
참고문헌	47
초록 (영문)	54

그림 목록

그림 1 내성 세포주를 확립하기 위해 망막모세포종 세포에 carboplatin을 처리하는 방법	13
그림 2 Carboplatin 내성 망막모세포종 세포주 확립 및 각 세포들의 carboplatin에 대한 IC ₅₀ 확인	14
그림 3 DNA 단편화 분석(DNA fragmentation assay)을 통한 세포 사멸 효과 확인	16
그림 4 면역세포화학(Immunocytochemistry)을 통한 cleaved caspase-3 발현 확인	19
그림 5 동물실험에서 내성 세포주의 carboplatin에 대한 내성 확인 실험 방법	22
그림 6 동물 실험에서 carboplatina에 대한 내성 세포 주의 내성 확인	23
그림 7 부모 세포와 내성 세포의 성장 곡선 확인	27
그림 8 형광 활성 세포 분류기(Fluorescence Activated Cell Sorter)를 통한 세포 주기 확인.....	29

그림 9 Western blot을 통한 세포주기 단백질 변화 확인	32
그림 10 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction)을 통한 다약제내성 (multidrug resistant) 유전자의 발현 확인	36
그림 11 다약제내성 분석(Multidrug Resistance Assay) 을 통해 내성 세포주의 약물 유출 능력 평가 확인	38

약어 표

ATCC, American Type Culture Collection

ATP7A, Menkes' protein (MNK), ATPase copper transporting alpha

ATP7B, Wilson disease protein (WND), ATPase copper transporting beta

ABCB1, ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1, MDR1, P-gp

ABCC1, ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1, MRP1

ABCC2, ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2, MRP2

ABCG2, ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2, BCRP

BCA, bicinchoninic acid

BCRP, ATP-binding cassette sub-family G member 2

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO, Dimethyl sulfoxide

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

FBS, fetal bovine serum

FACS, fluorescence activated cell sorter

H&E, haematoxylin and eosin

IC₅₀, half maximal inhibitory concentration

MDR, multidrug resistance

MRP, Multidrug Resistance Protein

PBS, phosphate-buffered saline

PI, propidium iodide

P-gp, P-glycoprotein

qRT-PCR, quantitative real time polymerase chain reaction

RPMI, Roswell Park Memorial Institute

WST-1, Water-soluble Tetrazolium salts

서 론

망막모세포종은 어린이에서 가장 흔한 안구 악성 종양이다 (1). 전 세계적으로 신생아의 15,000에서 20,000 명중 한 명 정도 발생하는 것으로 알려져 있다 (2, 3). 조기 진단 및 치료 방법의 발달로 생존율이 90% 가까이 이르며 치료를 통해 생명을 보전 할뿐만 아니라 안구 보존, 시력 유지가 가능하게 되었다. 하지만 전신 전이가 일어날 경우 생명을 위협할 수도 있는 질환으로 조기 발견과 진단이 매우 중요하다 (3).

망막모세포종의 주된 치료 방법은 안구 적출 수술, 국소치료법, 항암화학요법이 있다 (4-6). 안구 적출은 망막모세포종의 재발을 막는 가장 확실한 치료법이다. 하지만 3세 이하 어린 아이들에게 안구 적출 수술을 시행할 경우 시력에 관련 문제뿐만 아니라 정신적으로 문제를 일으킬 수 있기 때문에 최대한 안구를 보존하려 하고 있다 (7). 두 번째로 국소치료법으로는 방사선치료, 온열치료, 냉동치료 등이 있다. 이러한 국소치료들의 효능은 입증되었지만 방사선치료로 인해 안면 기형, 백내장 및 방사선 망막병증의 발생률이 증가하고 또 두 번째 종양의 발병률이 증가한다는 보고가 있다 (5). 세 번째로 정맥내 또는 동맥내로 항암제를 투여하는 항암화학요법이 있다 (8). Carboplatin, vincristine 및 etoposide를 기본으로 하는 항암화학요법은 시신경 및 안구 밖으로 전이가 있을 경우에는 반드시 시행해야 하며, 전이가 있을 가능성이 있는 고 위험 군에서도 재발 및 전이를 막기 위해 사용해야 한다 (9). 하지만 이러한 치료에 있어서 가장 문제가 되는 것은 바로 항암제에

저항성이 있는 세포가 생기는 것이다. 이러한 세포는 나중에 다시 재발의 요인이 되어 다시 치료를 받거나 치료가 안될 경우에는 안구를 적출하게 되는 상황이 벌어지게 되는 것이다 (10-14).

흔히 내성은 암에 내재되어 있지만, 치료를 반복적으로 받으면서 내성이 생기게 되는 경우가 있다. 이렇게 광범위한 항암제에 반복적으로 노출되어 내성이 생기게 되는 가장 일반적인 이유는 세포 내 항암제를 검출하고 방출하는 다양한 에너지 의존성 전달체의 발현이 있을 수도 있지만, 약물 유도를 포함한 다른 저항 메커니즘을 획득했을 수도 있다는 보고가 있다 (15).

이러한 맥락에서, 항암제 망막모세포종에 대한 효과적인 2차 치료 방법을 개발해야 한다. 항암화학요법에 의해 내성을 갖게 되는 종양의 기전과 이들을 조절하는 대책에 대한 연구를 용이하게 하기 위해 유방암 및 폐암 등에서의와 같이 망막모세포종도 항암제 세포주가 필요한 실정이다. 그러나 불행하게도 화학 저항성 망막모세포종 세포주를 개발하려는 시도는 제한적이며 특정 특성이 결여되어 있다 (16, 17). 이러한 시점에서 본 연구는 화학 저항성이 있는 망막모세포종을 확립하고 이 세포주가 기존 세포주와 어떤 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

화학 저항성을 갖은 세포주를 확립할 때 사용한 항암제는 carboplatin (diammine [1,1-cyclobutane dicarboxylato (2) -0,0'] platinum)이다. Carboplatin은 망막모세포종의 치료에 사용되는 가장 일반적인 약제 중 하나로서 정맥 주사, 눈 주위 및 동맥내 전달에 사용되고 있다 (5). Carboplatin은 세포 내부에서 양전하를 띠게 된다. 이것은 carboplatin이 DNA, RNA 및 단백질을 포함하여 세포 내에서 친 핵성 분자와 상호 작용하여 백금의 부가물을 형성하게 된다 (18).

이 과정은 carboplatin을 purine 염기에 공유 결합을 시켜 DNA-단백질 또는 DNA-DNA 상호 작용을 형성시킴으로써 일어난다 (19). DNA와 carboplatin 사이의 연결은 DNA에 병변을 일으킬 수 있다. DNA 가닥 사이의 교차 결합은 DNA 복제 과정을 억제하고 복제 오류를 발생시켜 세포 사멸을 유도 시킨다 (20). 하지만 이전 보고들에 따르면 몇몇 환자들이 초기에는 약물에 반응을 하지만 나중에 약물 저항성이 생긴다는 것을 알 수 있다 (21).

본 연구에서는 두 개의 망막모세포종 세포주인 Y79와 SNUOT-Rb1 (22)에서 carboplatin의 농도를 단계적으로 증가시킴으로써 carboplatin 내성 망막모세포종 세포를 개발했고 그 특성들을 조사하였다. Y79 세포에 carboplatin을 처리하여 확립한 세포는 Y79/CBP라 하였고, SNUOT-Rb1 세포에 carboplatin을 처리하여 확립한 세포는 SNUOT-Rb1/CBP라고 명하였다. 그러한 다음, 실제로 Y79/CBP 및 SNUOT-Rb1/CBP에서 세포 실험 및 동물 실험을 통해 carboplatin 내성이 나타나는지 확인을 하였다. 그리고 세포의 특성으로 세포 성장의 변화에 대해 carboplatin 내성 세포와 부모 세포와의 차이를 형광 활성 세포 분류기와 western blot을 통해 확인하였다. 두 번째로 왜 이러한 내성을 갖게 되었는지에 대한 내성 관련 유전인자들의 변화에 대해 실시간 중합효소연쇄반응과 다약제내성 분석을 통해 확인하였다.

실험 재료 및 방법

1. 세포 배양

실험에 사용된 두 개의 망막세포주인, Y79 (ATCC)와 SNUOT-Rb1를 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Life Technologies, CA, USA), penicillin (100 U/mL) 및 streptomycin (100 µg/mL)가 들어간 RPMI-1640 (WelGENE) 배지에 배양한다. 37℃와 95% 공기 및 5% CO₂의 가습이 되는 배양기에서 배양하였다. 배양한 배지는 3일마다 교체하고 배양된 세포를 도립 현미경 (inverted microscope Carl Zeiss, VA, USA)을 통해 매일 관찰 하였다.

2. Carboplatin 내성 세포주의 확립

Carboplatin 내성 세포는 점차적으로 carboplatin의 농도를 증가시킴으로써 확립되었다. 배양 접시에 세포가 70-80%의 밀도로 성장했을 때 carboplatin (C2538, Sigma)을 첨가했다. 2 일간의 carboplatin 노출 후, 살아남은 세포만을 carboplatin이 없는 배지로 다시 배양 했다. 살아남은 세포가 다시 70-80% 분포로 성장하면, carboplatin을 세포에 다시 처리했다. 각각 같은 농도를 3회씩 반복 하였다 (그림 1). 한 사이클이 지나면 다음 농도로 다시 그림 1과

같은 사이클을 진행하였다. 농도의 증가는 다음과 같다. Y79/CBP 세포는 15.4, 46.2, 92.4, 138.6 μM 의 농도로 carboplatin을 처리하고 SNUOT-Rb1/CBP은 10.5, 31.5, 63, 94.5 μM 의 농도로 처리 하였다. 농도가 증가될 때마다 다음 연구를 위해 세포를 -80°C 에 냉동 보관을 하였다.

3. 세포 생존 분석 및 세포 독성 측정

세포 생존 분석(Cell viability assay)은 EZ-Cytox (WST-1, DOGEN) 분석 키트를 사용하였고 분석 방법은 제조자의 지시에 따라 시행하였다. 세포를 1×10^4 개씩 96-well plate에 분주하고 배양을 하였다. 다음날, 세포에 50, 100, 200 400, 800 μM 의 농도로 carboplatin을 처리하고 48시간 동안 다시 배양 하였다. WST-1 용액을 각 well에 첨가하고 37°C 에서 3시간 더 배양했다. 흡광도는 microplate 판독기(Molecular Devices)를 사용하였고 450 nm/620 nm에서 측정 하였다. 각각의 실험은 3 번 반복하였다.

4. DNA 단편화 분석 (DNA fragmentation assay)

세포 1×10^7 개를 20 μl 의 TES lysis buffer (20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 10% SDS, 5 M NaCl)로 용해시켰다. 10 μl 의 RNase cocktail

(RNase A를 500 units/ml, RNase T1을 20,000 units/ml)을 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. 이어서, 10 μ l의 Proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하고, 50℃에서 1시간 동안 노출시켰다. DNA 샘플을 2% agarose gel에 넣었고 4시간 동안 35 V로 분리를 하였다. 최종적으로 Molecular Imager Gel Doc XR + System (1708195, Bio-Rad)을 사용하여 밴드를 확인하였다. 각각의 실험은 3번 반복하였다.

5. 면역세포화학 (Immunocytochemistry)

세포를 배양 슬라이드 위에 배양하였다. PBS로 세척한 후, 실온에서 15분 동안 4% 포르말데히드로 고정시켰다. 다시 PBS로 세척한 후, 고정된 세포를 0.2% Triton X-100로 5분 동안 노출시켜 투과성을 높였다. 다시 PBS로 세척한 후 슬라이드를 Universal Blocking Reagent (Biogenex)에 10분 동안 반응시킨 다음 4℃에서 cleaved caspase-3 항체(1: 1,000; 9664, Cell Signaling)를 반응시켰다. 다음 날 슬라이드를 PBS로 헹구고 1시간 동안 2차 항체(Alexa 594-conjugated secondary antibody, Molecular Probes)를 상온에 반응시켰다. 핵 염색은 DAPI를 사용하였다. 형광 현미경(Leica)으로 형광 이미지를 확인 하였다.

6. 실험 동물

6주령 수컷 BALB/c nude 생쥐를 Central Laboratory Animal에서 구입했다. 생쥐는 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있으며 낮과 밤을 12시간 주기로 방에서 유지시켰다. 모든 동물 실험은 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 와 서울대학교 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받은 지침에 따라 수행되었다.

7. 망막모세포종 세포의 안구내 이종 이식과 안구내 약물 저항성의 평가

동물 실험을 위해, 부모 세포와 내성 세포를 배양 접시에서 떼어낸 후 PBS로 세척하고 1×10^7 개씩 모았다. Serum-free RPMI-1640으로 현탁 시킨 뒤 생쥐 오른쪽 눈의 유리체강내에 1×10^4 개의 세포($1 \mu\text{L}$)를 주입하였다. 2주 후, carboplatin은 부모 세포의 IC_{50} 보다 3 배 높은 농도로 주사하였다 (Y79 및 Y79/CBP : $420 \mu\text{M}$, SNUOT-Rb1 및 SNUOT-Rb1/CBP : $300 \mu\text{M}$). 4주 뒤, CO_2 챔버에서 생쥐를 희생시키고, visual grading system (23)을 사용하여 종양 형성을 평가하고, 적출한 눈은 파라핀 블록을 만들어 섹션을 한 뒤 헤마톡실린과 에오신(haematoxylin & eosin, H&E) 염색을 시행하였다.

8. 세포 성장 측정

세포를 떼어 내기 위해 RPMI-1640 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어냈다. 세포를 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 의 농도로 배양 배지에 재현 탁하고 12-well microplate에 세포를 배양했다. 총 7일 동안 2일마다 각각 3개의 well로부터 세포를 계수하였다. 각각의 세포수가 2배가 되는 시간은 다음 식에 따라 계산되었다.

$$\text{Doubling time} = \frac{\text{duration} * \log(2)}{\log(\text{Final concentration}) - \log(\text{Initial concentration})}$$

9. 형광 활성 세포 분류기 분석을 통한 세포 주기 분석

Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 떼어낸 후 4℃에서 1,200 rpm, 5분간 원심 분리 한 뒤, 상청액을 제거하고 세포를 PBS로 2회 재현탁 했다. 1시간 동안 4℃에서 70% 에탄올로 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 다시 PBS로 세척하고 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase로 1시간 동안 처리 했다. 그러한 다음 세포를 PI로 염색하고 FACS flow cytometer (BD Accuri C6 Plus, BD)로 검사 하였다. 각각의 실험은 3번 반복하였다.

10. Western blot assay

단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트 (Thermo)를 사용하여 측정하였다. 동등한 양의 단백질을 10 및 12% SDS-PAGE를 사용하여 전기 영동으로 분리하고 nitrocellulose membranes (AmershamTM ProtranTM, GE)으로 옮겼다. Nitrocellulose membranes에 전달된 단백질은 4°C에서 각각의 항체에 밤새 반응시켰다. 사용한 항체들은 cyclin-D1 (1:1,000; 2978, Cell Signaling), cyclin-D3 (1:1,000; 2936, Cell Signaling), p18 (1:1,000; 2896, Cell Signaling), p21 (1:1,000; 2947, Cell Signaling), β -actin (1:5,000; A2066, Sigma-Aldrich)이다. 다음날, membrane을 PBST로 세척하고 2차 항체 (peroxidase-conjugated secondary antibody, Santa Cruz)를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 membrane을 PBST로 세척하고 EZ-Western Lumi Pico solution (DOGEN)에 반응시켰다. 결과는 imageQuant LAS4000 (GE)을 사용하여 확인하였다.

11. 실시간 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)

RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen)를 사용하여 얻었고, High Capacity cDNA kit (Life Technologies)를 사용하여 cDNA를 만들었다. 실시간 중합효소연쇄반응은 TaqMan Fast Advanced Master Mix 와 Taqman

probe (Life Technologies)를 사용하여 수행 하였다. Primer 와 probe는 ABCB1 (MDR1, Hs00392137_m1), ABCC1 (MRP1, Hs00967238_m1), ABCC2 (MRP2, Hs01091188_m1), ABCG2 (BCRP, Hs01053790_m1), ATP7A (Hs00163707_m1), ATP7B (Hs00163739_m1), GAPDH (Hs0275899_g1) 이다. 실시간 중합효소연쇄반응 프로그램은 중합효소 활성(polymerase activation)을 위해 95℃에서 20초로 구성했고, 변성(denaturation)을 위해 95℃에서 1초, 어닐링/확장(annealing/extension)을 위해 60℃에서 20 초로 구성했다. 총 40 사이클이 수행되었다. 형광 신호는 증폭 된 DNA의 양을 모니터 하기 위해 모든 실시간 중합효소연쇄반응 사이클(72℃에서 10초)의 연장 단계(elongation step)의 끝에서 수집되었다. ΔC_t 는 유출 유전자에서 GAPDH의 C_t 를 뺀 값으로 계산되었다. 다음으로 ΔC_t 는 내성 세포의 ΔC_t 에서 모세포의 ΔC_t 를 뺀 값으로 계산 하였다. 유전자 발현의 변화는 방정식 $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 에 의해 계산되었다.

12. 다약제내성 분석(Multidrug Resistance Assay)

다약제내성 분석은 EFLUXX-ID Green Multidrug Resistance Assay Kit (ENZ-51029-K100, Enzo)의 방법을 참고하여 실험하였다. 세포를 떼어 내고 계수한 다음, RPMI-1640 배지로 같은 수의 세포(5×10^5

cell/mL)로 희석 하였다. 각 그룹에 저해제로는 MDR1 (ABCB1)의 저해제로 verapamil (50 μ M), MRP (ABCC) 저해제로 MK571 (100 μ M), BCRP (ABCG2) 저해제로 novobiocin (100 μ M)을 사용하였다. 저해제와 DMSO를 처리하고 재현탁 하였다. 37℃에서 10분간 배양 하였다. 녹색 염료 (green dye)를 첨가하고 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 분석에서 죽은 세포를 제외하기 위해 PI (propidium iodide)를 5분 동안 세포에 처리했다. 차가운 PBS로 세포를 한 번 세척한 뒤 BD Accuri C6 Plus (BD)를 사용하여 데이터를 얻었다. BD Accuri C6 Software를 사용하여 데이터를 분석했다.

13. 통계처리

GraphPad Prism 5 (GraphPad)를 사용하여 통계 분석을 시행하였다. 실험군과 대조군 간의 차이는 t-test와 분산분석(ANOVA)에 의해 비교하였고 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결 과

1. Carboplatin 내성 망막모세포종 세포주 확립

Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP는 각각 부모 세포 Y79와 SNUOT-Rb1에 유사한 형태학적 특성을 보였다 (그림 2A). 반대로 세포 간 carboplatin 감수성에는 확실한 차이가 있었다. Y79 세포에서 carboplatin의 IC_{50} 농도는 $140 \pm 19.2 \mu M$ 이었고 Y79/CBP는 $499 \pm 56.8 \mu M$ 이었다 (그림 2B). 또한 SNUOT-Rb1에서 carboplatin의 IC_{50} 은 $105 \pm 15.3 \mu M$ 이었고 SNUOT-Rb1/CBP의 IC_{50} 은 $525 \pm 35.5 \mu M$ 으로 증가했다 (그림 2B). DNA 단편화 현상을 확인한 결과, Y79와 SNUOT-Rb1 세포에 carboplatin을 처리했을 때 세포 사멸로 인한 DNA 단편화 현상이 강하게 나타났지만 내성 세포에서는 나타나지 않았다 (그림 3A, B). 동일한 처리 조건에서, 세포 내 cleaved caspase-3는 부모 세포에서 높게 발현되었지만 내성 세포에서는 상대적으로 발현되지 않았다 (그림 4A, B).

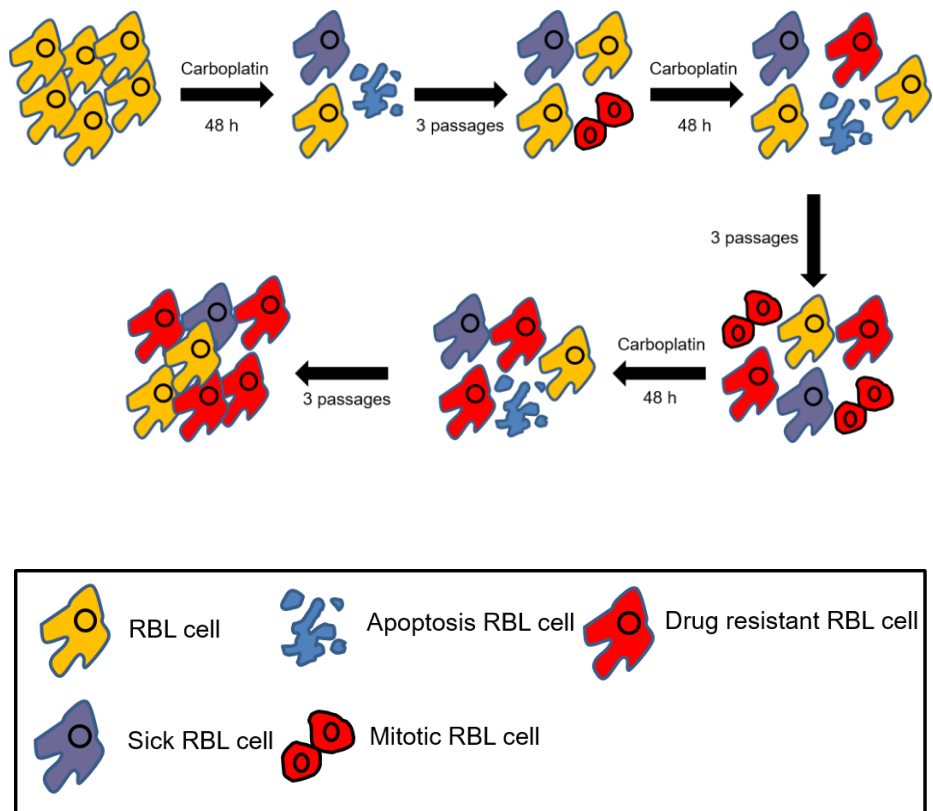
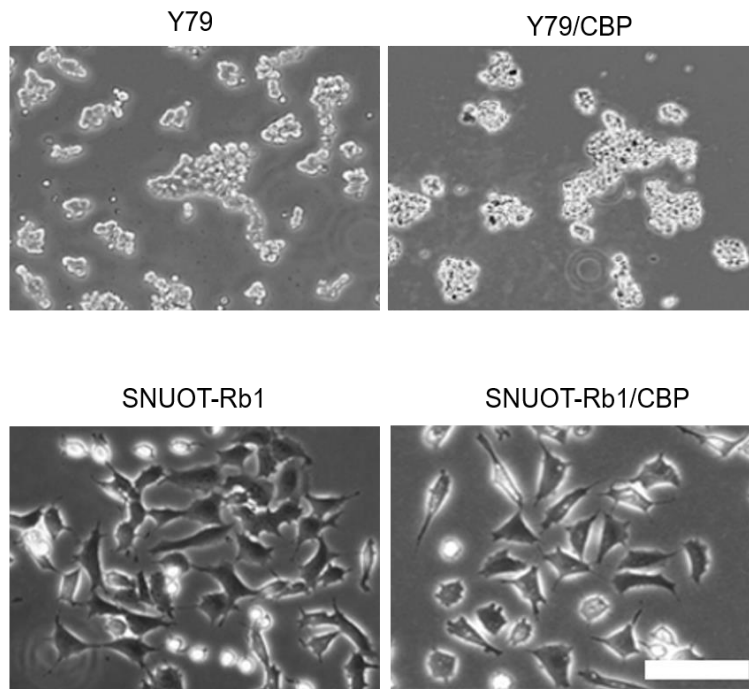
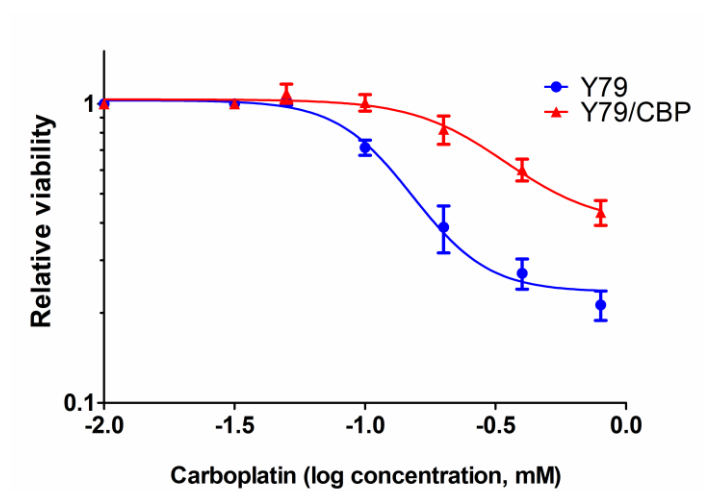


그림 1. 내성 세포주를 확립하기 위해 망막모세포종 세포에 carboplatin을 처리하는 방법.

A



B



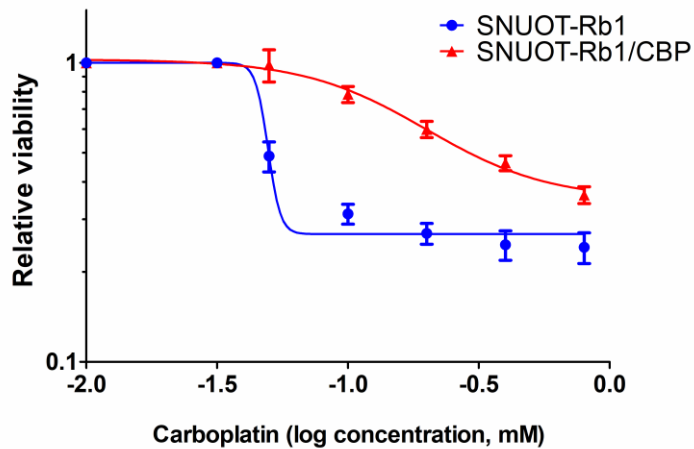
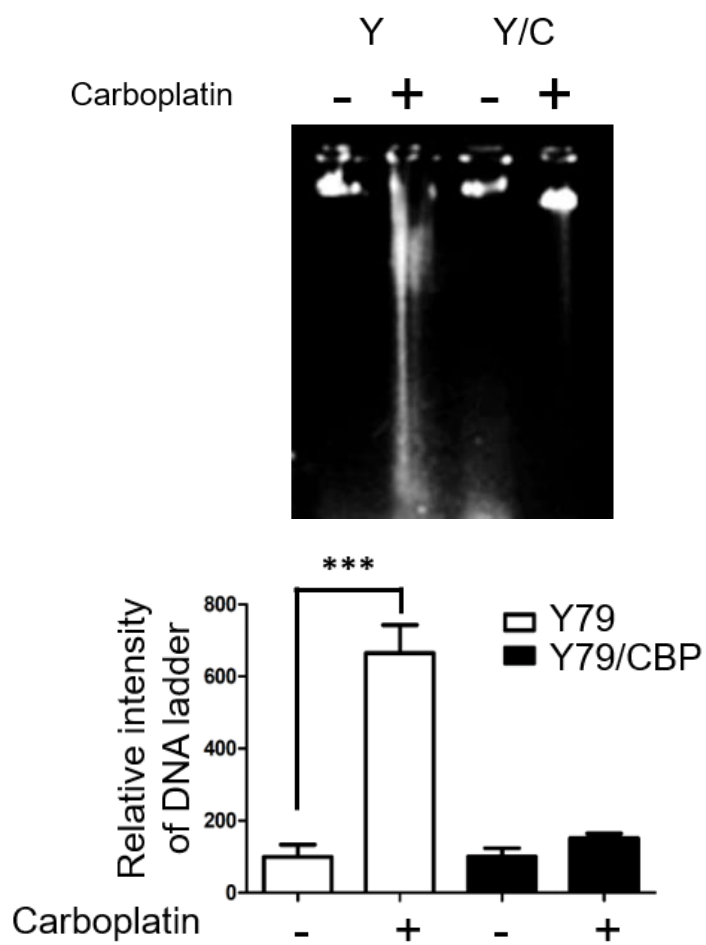


그림 2. Carboplatin 내성 망막모세포종 세포주 확립 및 각 세포들의 carboplatin 에 대한 IC₅₀ 확인.

(A) 부모 세포와 내성 세포를 도립 현미경(inverted microscope)으로 관찰하였다. (B) Carboplatin에 48시간 노출시킨 뒤 Y79 및 Y79/CBP, SNUOT-Rb1 및 SNUOT-Rb1/CBP의 IC₅₀을 확인 하였다. Y79의 IC₅₀ 농도는 $140 \pm 19.2 \mu\text{M}$ 이었고 Y79/CBP는 $499 \pm 56.8 \mu\text{M}$ 이었다. SNUOT-Rb1의 IC₅₀은 $105 \pm 15.3 \mu\text{M}$ 이었고 SNUOT-Rb1/CBP의 IC₅₀은 $525 \pm 35.5 \mu\text{M}$ 이었다.

A



B

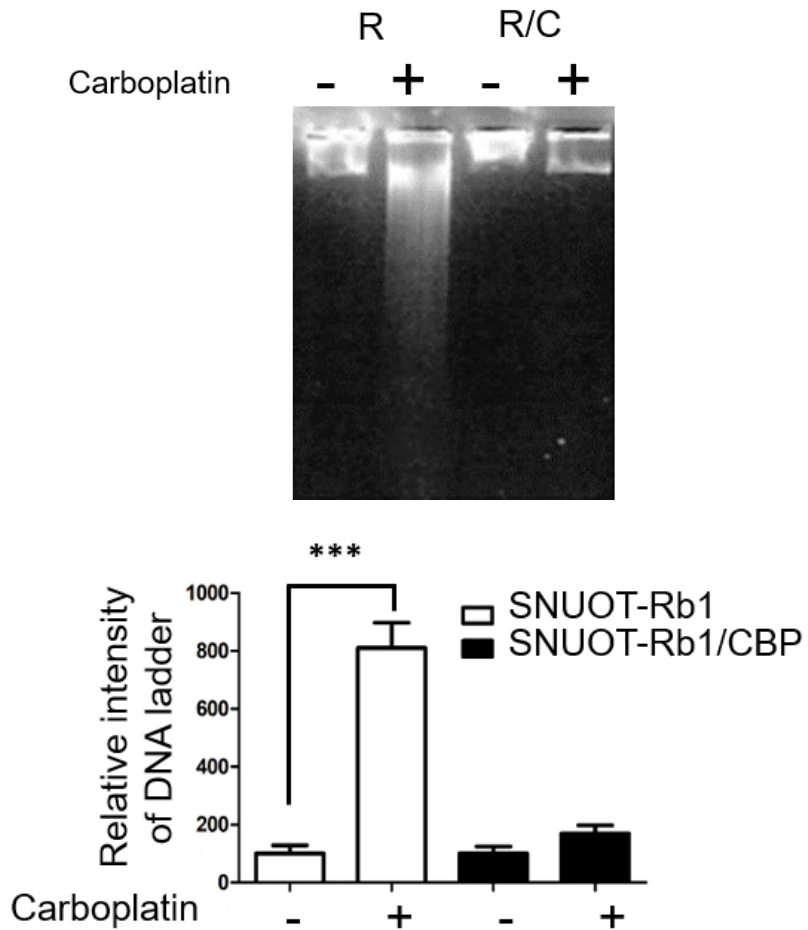
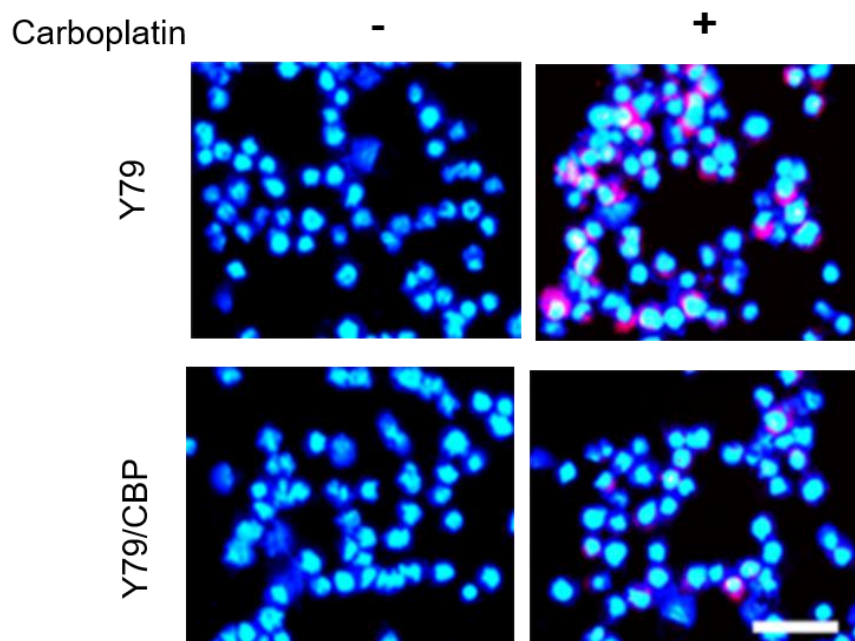


그림 3. DNA 단편화 분석 (DNA fragmentation assay)을 통한 세포 사멸 효과 확인.

(A), (B) 부모 세포 IC₅₀ 농도의 3 배 되는 농도를 처리한 후 24 시간 뒤 측정한 결과, Y79, SNUOT-Rb1 세포에서는 세포 사멸에 의한 DNA 단편화 현상을 확인할 수 있었지만 내성이 있는 세포에서는 그러한

현상이 일어나지 않았다. R, SNUOT-Rb1; R/C, SNUOT-Rb1/CBP; Y,
Y79; Y/C, Y79/CBP. ***, $P < 0.001$.

A



B

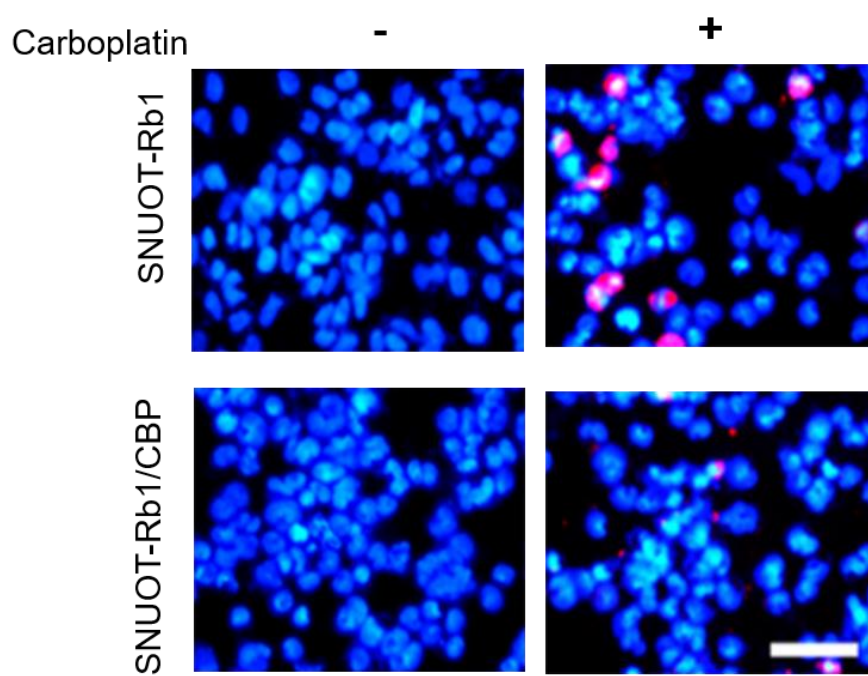


그림 4. 면역세포화학 (Immunocytochemistry)을 통한 **cleaved caspase-3** 발현 확인.

(A), (B) 부모 세포 IC_{50} 농도의 3배 되는 농도를 처리한 후 24시간 뒤 면역세포화학을 시행한 결과, Y79, SNUOT-Rb1 세포에서는 세포사멸에 의한 cleaved caspase-3의 발현을 확인할 수 있었지만 내성이 있는 세포에서는 cleaved caspase-3의 발현 현상이 줄어들었다. Scale bar, 50 μ m.

2. 동물 실험에서 Y79/CBP 및 SNUOT-Rb1/CBP 의

carboplatin 내성 확인

망막모세포종 세포 (1×10^4 cells/ μ l)를 생쥐의 유리체강내에 주사한 후 2주 뒤, carboplatin을 유리체강내에 다시 주사를 하였다. 그리고 4주 뒤 안구의 종양 형성을 평가 하였다 (그림 5). Carboplatin 주입으로 인해 Y79 와 SNUOT-Rb1 세포를 주입하여 형성된 안구내 종양은 억제되었다. 반면에, Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP를 주입하여 형성된 안구내 종양에서는 carboplatin 처리에도 불구하고 계속 종양이 형성되었다. 헤마톡실린과 에오신 (haematoxylin & eosin, H&E) 염색에서도 부모 세포와 carboplatin 내성 망막모세포의 안구 내 종양 형성의 차이를 확인하였다 (그림 6A, B).

Visual grading에 따르면, 대부분 부모 세포에 carboplatin을 주사한 군을 보면 Grade 2 (plaque), Grade 3 (mass) 등급이 매겨졌지만, 대조적으로, carboplatin 내성 세포로 형성된 종양 군에 주사한 안구를 보면 Grade 3 (mass), Grade 4 (mass filling the eyeball) 등급이 매겨진 것을 확인할 수 있었다. 내성 세포로 만들어진 종양은 carboplatin을 주사하여도 종양이 계속 성장하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 7C).

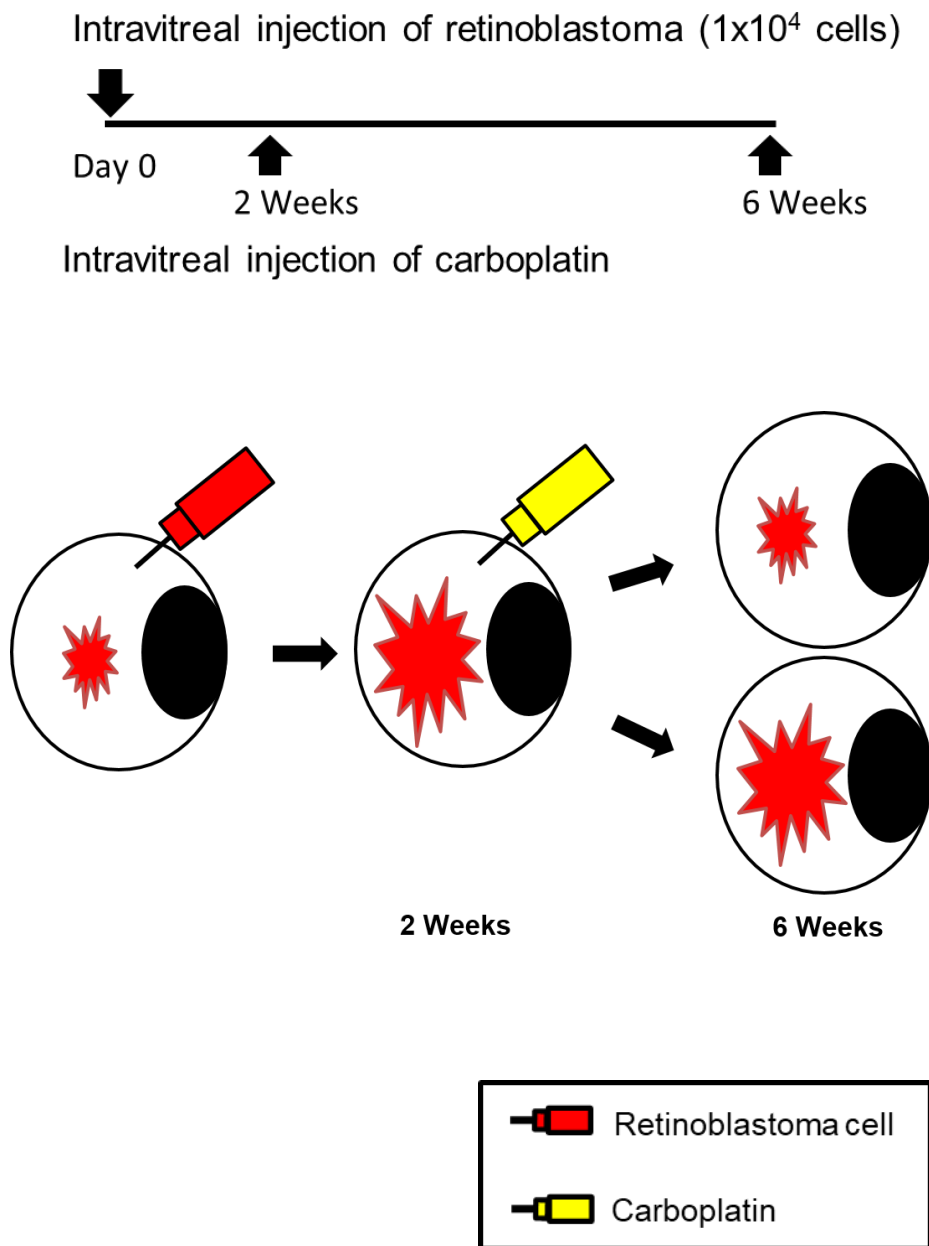
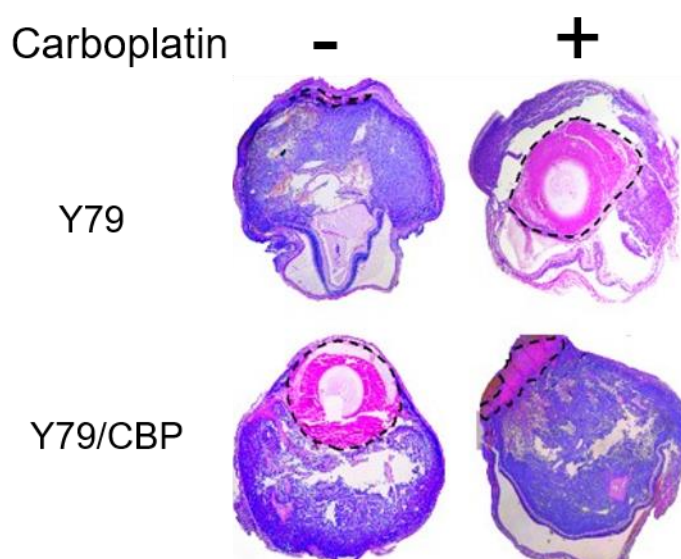
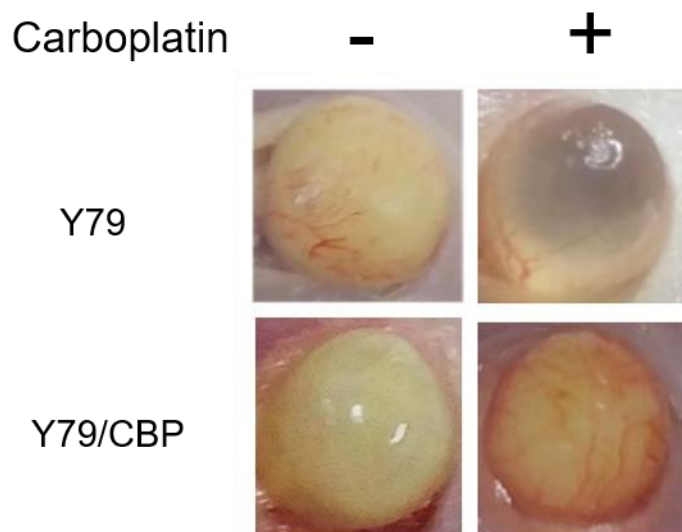
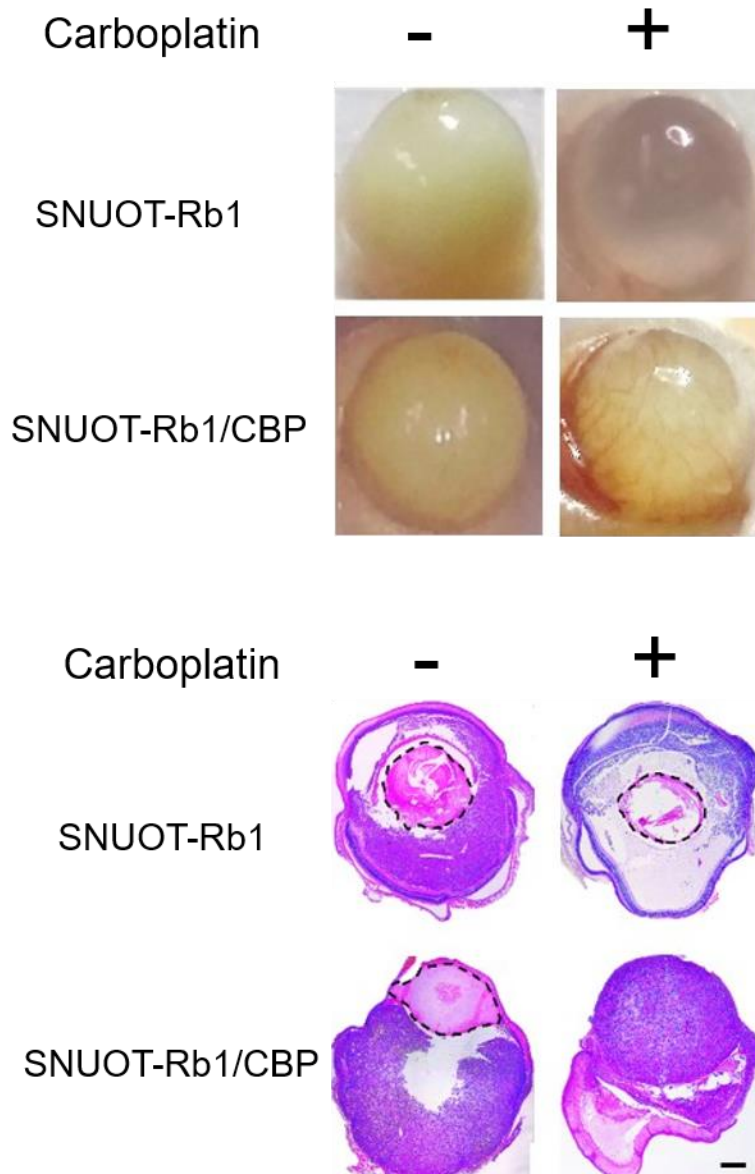


그림 5. 동물실험에서 내성 세포주의 carboplatin에 대한 내성 확인
실험 방법.

A



B



C

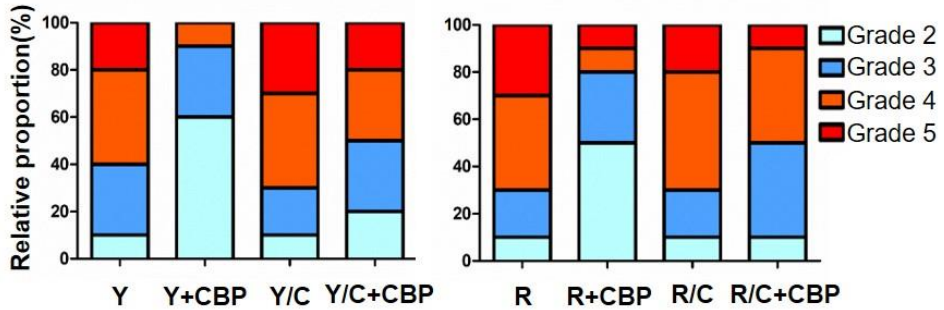


그림 6. 동물실험에서 carboplatin 에 대한 내성 세포주의 내성 확인.

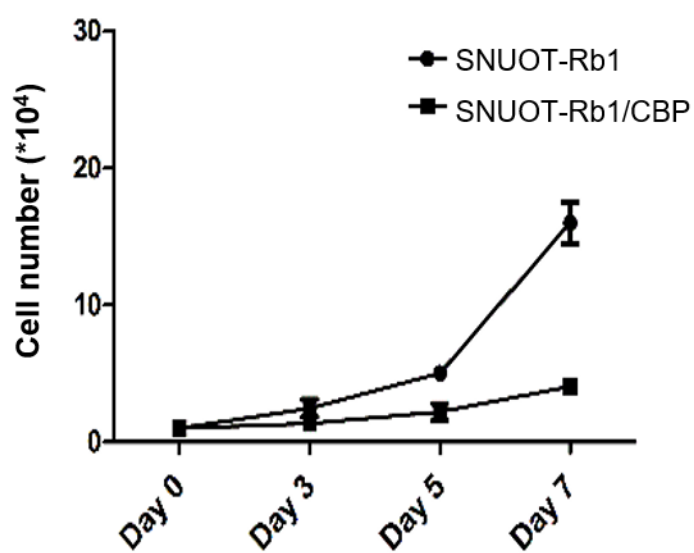
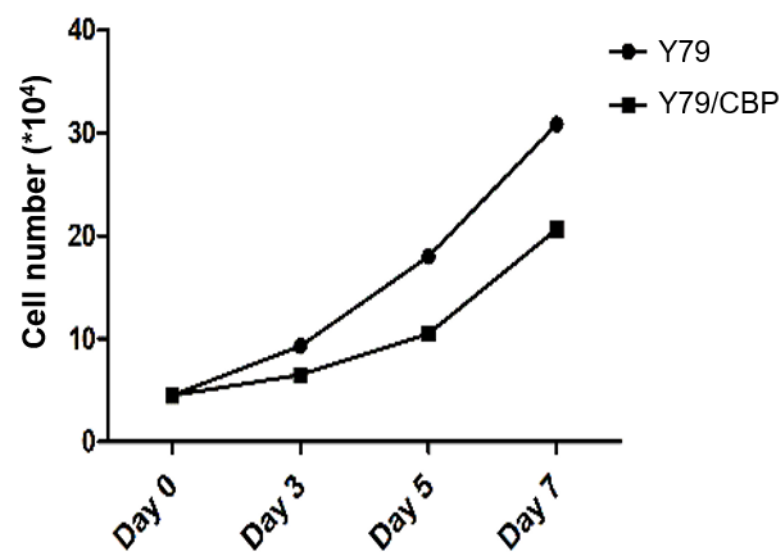
(A), (B) Y79 와 SNUOT-Rb1 세포를 주입한 안구 내 종양은 IC₅₀의 배 되는 농도로 주사한 결과 종양 형성이 억제 되었다. 반면, Y79/CBP 와 SNUOT-Rb1/CBP 를 주사한 안구에서는 종양은 고농도의 carboplatin 주사에도 불구하고 계속 종양 형성을 유지했다. 또 이것을 헤마톡실린과 예오신 염색을 통해 종양 형성 정도의 차이를 확인했다. (C) 전체 실험한 안구의 visual grading system 을 통해 분석한 결과 내성 세포주에 carboplatin 처치군에서 grade 4, grade 5 가 50% 이상 차지하고 있다. Grade 2, plaque; Grade 3, mass; Grade 4, mass filling the eyeball; Grade 5, eyeball enlargement. CBP, carboplatin; R, SNUOT-Rb1; R/C, SNUOT-Rb1/CBP; Y, Y79; Y/C, Y79/CBP. Scale bar, 100 μ m.

3. Carboplatin 내성 망막모세포종 세포에서 G0/G1 단계에서 세포의 비율 증가

정상적인 배양 조건에서 세포 분열의 시간이 Y79/CBP는 3.2배 증가하였고 SNUOT-Rb1/CBP는 1.4배 증가한 결과 부모 세포보다 느리게 자라는 것을 확인했다 (그림 7A, B).

형광 활성화 세포 분류기(fluorescence activated cell sorter, FACS)를 통해 G0/G1 단계에서 세포의 비율이 부모 세포에 비해 내성 세포에서 증가 함을 보였다 (그림 8A, B). 또 western blot 분석을 통해 G0/G1 기와 관련된 단백질인 cyclin D1과 cyclin D3가 부모 세포에 비해 내성 세포에서 감소한다는 것을 밝혀냈다. 반대로, cyclin D1과 cyclin D3의 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p18과 p27의 발현은 부모 세포에 비해 내성 세포에서 유의하게 증가하였다 (그림 9C, D).

A



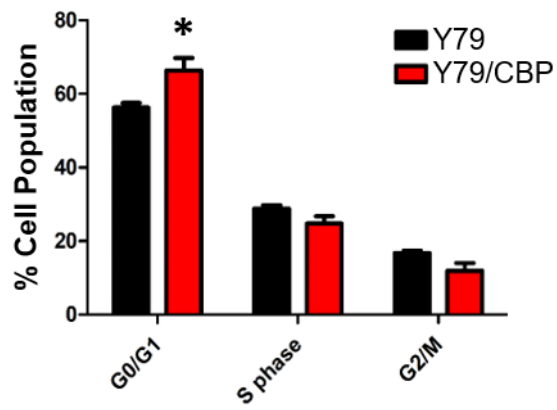
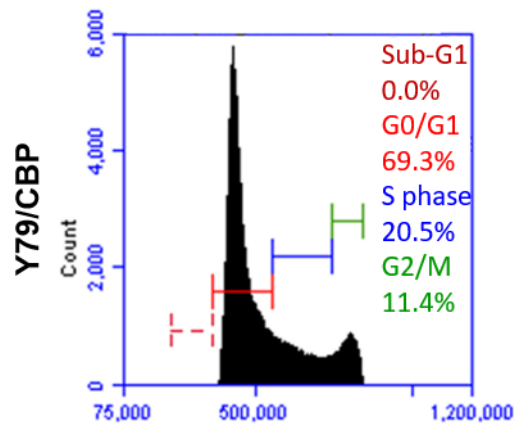
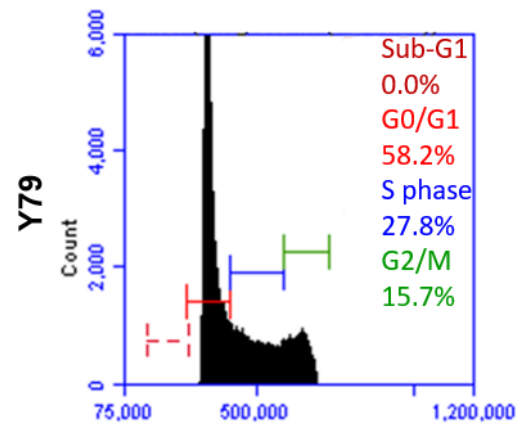
B

Cell line	Cell doubling time (h)	Cell line	Cell doubling time (h)
Y79	43.8	SNUOT-Rb1	24.2
Y79/CBP	62.58	SNUOT-Rb1/CBP	78.3

그림 7. 부모 세포와 내성 세포의 성장 곡선 확인.

(A) 각각의 세포가 두 배가 되는 데 필요한 시간을 구하기 위해 정해진 날마다 세포 수를 확인하였다. (B) 세포가 두 배가 되는데 걸리는 시간은 Y79 세포는 43.8시간, SNUOT-Rb1은 24.2시간이 걸렸다. 반면 내성이 있는 세포인 Y79/CBP는 62.58시간, SNUOT-Rb1/CBP는 78.3시간이 걸리는 것을 확인했다.

A



B

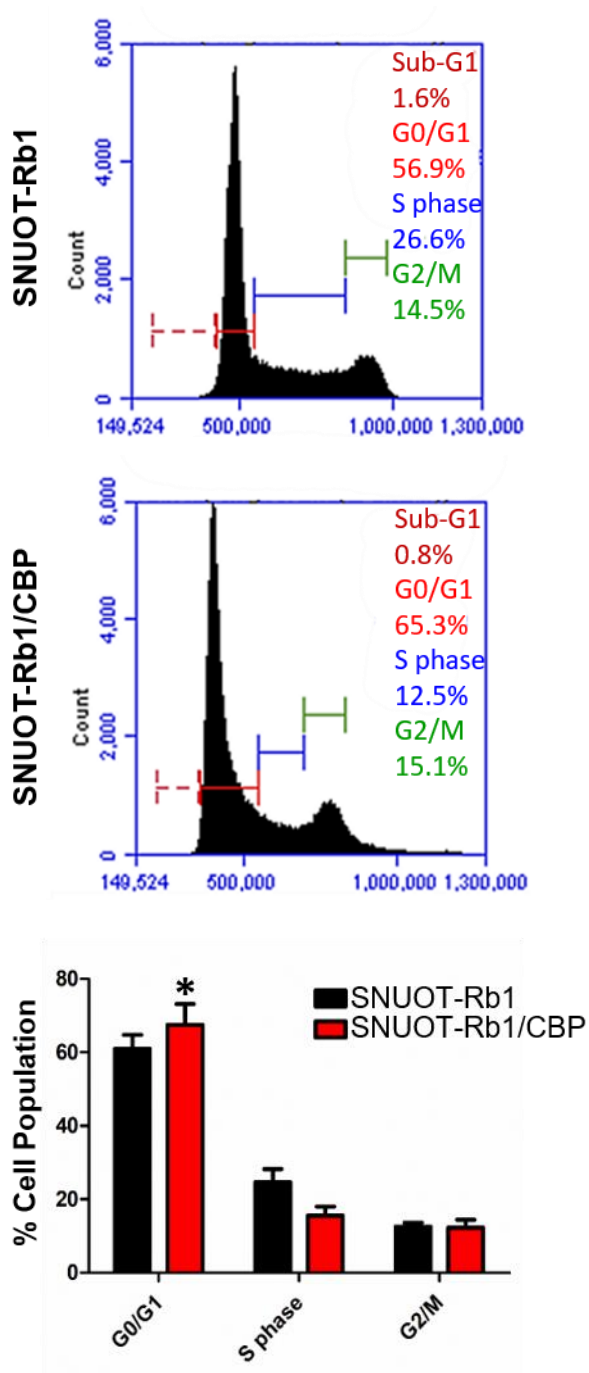
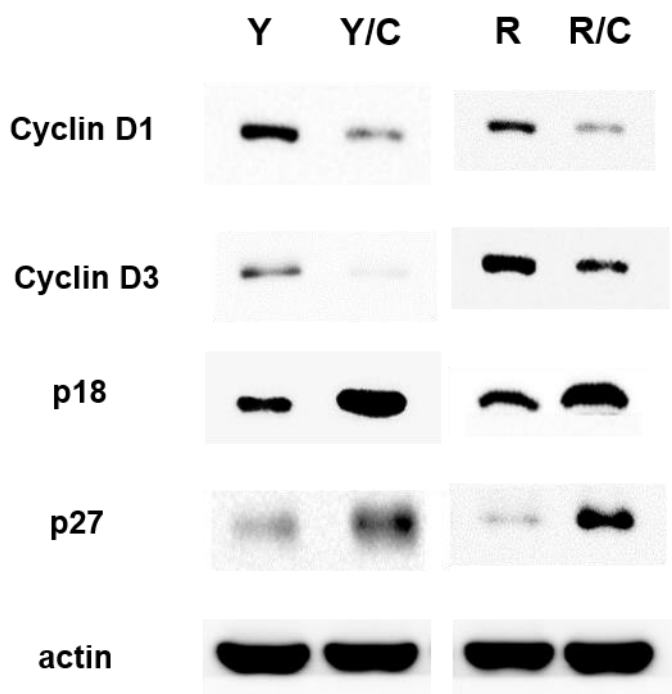


그림 8. 형광 활성화 세포 분류기 (fluorescence activated cell sorter)를

통한 세포 주기 확인.

(A), (B) 형광 활성화 세포 분류기를 통해서 확인한 결과 부모 세포에 비해 내성 세포에서 G0/G1기의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있다. Y79 세포에서는 G0/G1기가 58.2% 인 반면에 Y79/CBP는 69.3%로 증가 하였고, SNUOT-Rb1 세포에서는 G0/G1기가 56.9% 인 반면에 SNUOT-Rb1/CBP는 65.3%로 증가하였다. 통계는 Student's t-test를 사용했다. *, $P < 0.05$

A



B

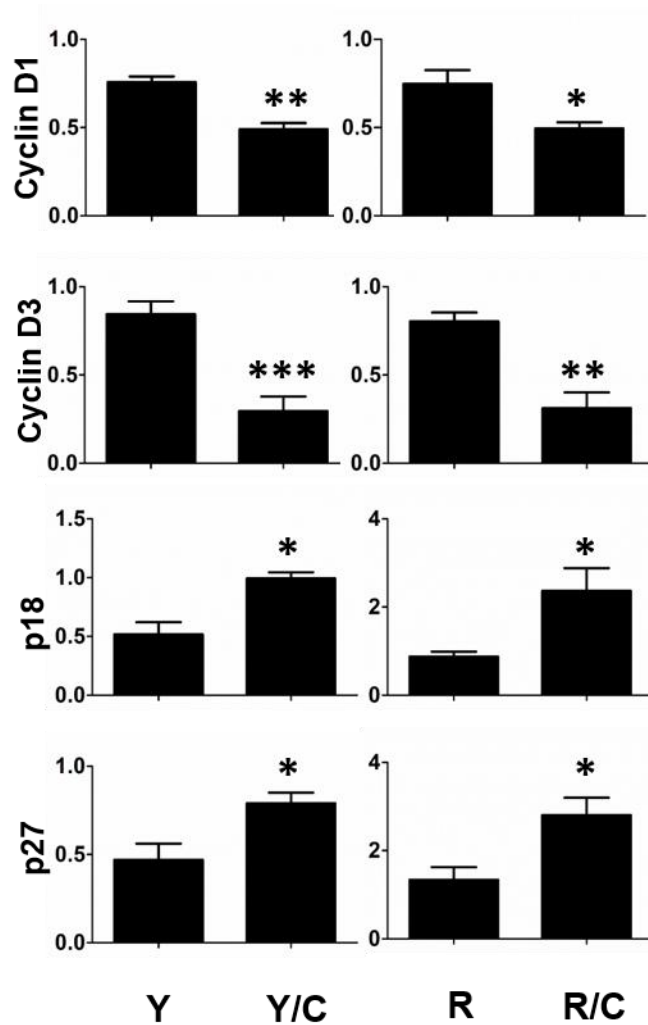


그림 9. Western blot 을 통한 세포주기 단백질 변화 확인.

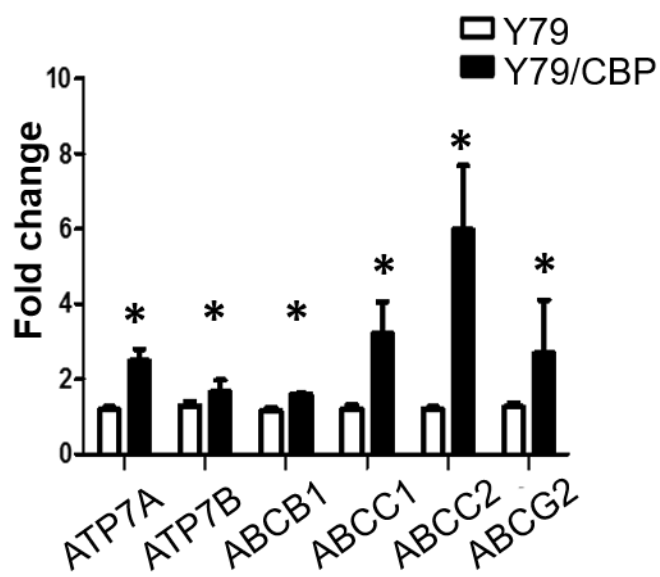
(A) 세포주기 단백질 변화는 western blot에 의해 확인되었다. cyclin D1과 cyclin D3의 수준은 부모 세포에 비해 내성 세포에서 감소하였고, 내성 세포에서는 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p18과

p27의 발현 양이 증가 하였다. Average \pm SD는 3 번의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다. R, SNUOT-Rb1; R/C, SNUOT-Rb1/CBP; Y, Y79; Y/C, Y79/CBP; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

4. Carboplatin 내성 망막모세포종 세포의 다약제내성 유전자 변화 및 약물 유출능력의 변화 확인

Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP의 특성을 좀더 밝히기 위해, 양적 실시간 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)을 사용하여 이들 carboplatin 내성 세포에서 다약제내성과 관련된 유전자의 발현을 부모 세포와 비교하여 평가했다. 흥미롭게도, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, ATP7A 및 ATP7B는 Y79/CBP 세포에서 증가하였고 ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2 및 ATP7B는 SNUOT-Rb1/CBP 세포에서 증가 하였다 (그림 10A, B). 이러한 결과에 따라 다약제내성 분석으로 약물의 유출 능력을 Verapamil (MDR1, ABCB1 inhibitor), MK571 (MRP1/2, ABCC1/2 inhibitor) 및 Novobiocin (BCRP, ABCG2 inhibitor)등의 억제제를 사용하여 부모 세포의 유출 능력으로 다시 돌아가는 지를 확인해 보았다. 그 결과 Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP에서 약물 유출 능력이 부모 세포보다 좋아 세포 내 형광을 적게 가지고 있음을 확인하였다. 하지만 억제제에 의해 부모 세포와 비슷하게 형광 물질을 세포 밖으로 내보내지 못하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 11A, B).

A



B

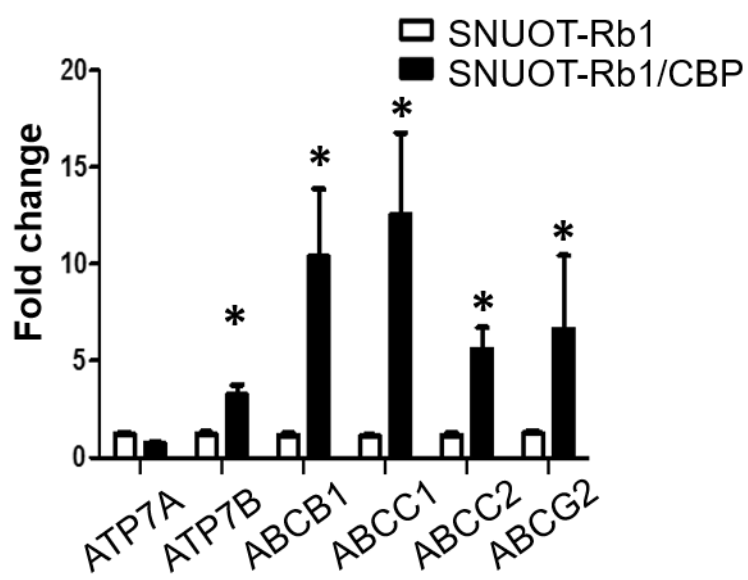
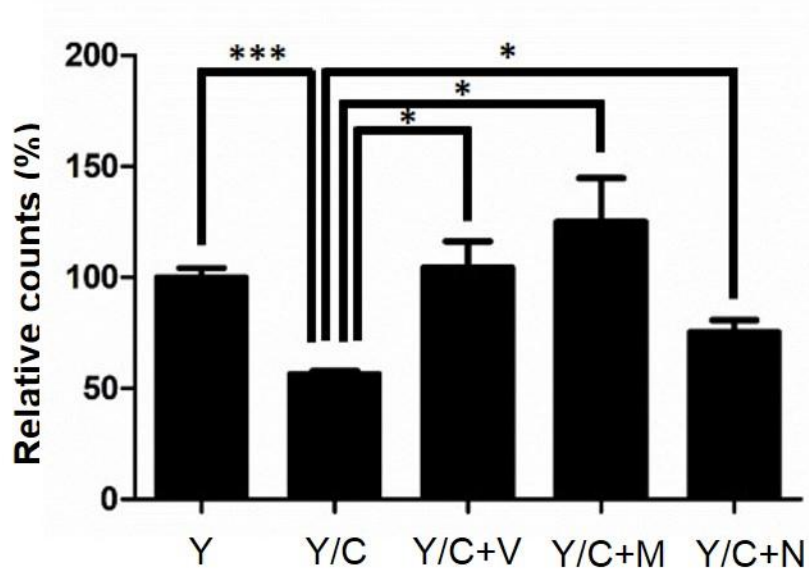


그림 10. 실시간 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)을 통한
다약제내성(multidrug resistant)유전자의 발현 확인.

다약제내성(multidrug resistant)과 관련된 유전자의 발현 수치를 부모 세포와 carboplatin 내성 세포를 비교하여 평가했다. (A) Y79/CBP 세포에서는 ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, ATP7A, ATP7B가 증가하였다. (B) SNUOT-Rb1/CBP 세포에서는 ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, ATP7B가 증가 하였다

A



B

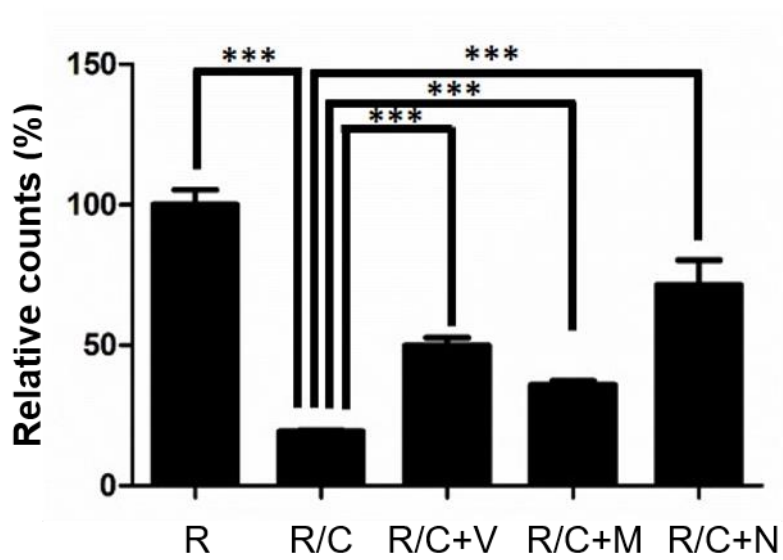


그림 11. 다약제내성 분석(multidrug resistance assay)을 통해

내성 세포주의 약물 유출 능력 평가 확인

(A) Y79/CBP에서 약물 유출 능력이 부모 세포보다 좋아서 세포 내 형광을 적게 가지고 있음을 확인하였다. 하지만 억제제에 의해 형광 유출 능력이 감소되어 형광의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. (B) SNUOT-Rb1/CBP에서도 마찬가지로 약물 유출 능력이 부모 세포보다 좋아서 세포 내 형광을 적게 가지고 있었으나 억제제에 의해 부모 세포와 비슷하게 형광의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. Student's t-test. V, verapamil; M, MK571; N, novobiocin; R, SNUOT-Rb1; R/C, SNUOT-Rb1/CBP; Y, Y79; Y/C, Y79/CBP.

*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

고 찰

망막모세포종의 화학치료 요법은 vancristine, ethoposide, carboplatin 을 사용하여 3 ~ 4 주마다 6 회 반복 투여 된다 (4). 항암화학요법의 효과가 입증되었지만 종종 내성 세포들이 살아 남아 치료를 어렵게 하고 있다. 항암 요법에 대한 내성은 환자의 개인차 및 종양의 체세포 유전 적 차이를 포함한 다양한 요인에 의해 발생한다. 종종 항암제에 대한 내성은 암에 내재되어 있지만 치료가 진행됨에 따라 또 치료 횟수가 증가함에 따라 획득 된 내성도 발생한다.

이를 바탕으로 본 연구에서는 대표적으로 사용되는 carboplatin을 사용해서 carboplatin 내성 망막모세포종 세포주인 Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP을 carboplatin의 농도를 증가시키는 방법으로 개발하였다.

세포 실험 및 동물 실험으로 Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP는 carboplatin에 대한 내성이 있음을 증명하였다. 세포 실험으로는 내성 세포주에 carboplatin을 처리하였을 때 세포 사멸에 의한 DNA 단편화 현상을 감소시켰고, cleaved caspase-3 발현도 부모 세포와 비교하여 감소하는 것을 확인했다.

망막모세포종 환자들에게서 반복적으로 항암화학요법을 진행하게

될 때 내성이 생기게 되는 다른 이유는 유리체강내 산소 농도가 낮고 유리질로 전달되는 약물 농도가 낮기 때문에 반복되는 낮은 약물 농도에 의해 종양에 내성이 생기게 된다 (8). 물론 혈관을 통한 항암화학요법으로 치료 효과를 보이는 많은 환자가 있다. 하지만 내성 세포가 생겨 치료의 어려움을 겪는 환자들에게는 다른 방법이 필요한 실정이다. 그래서 시행하는 방법 중 한가지가 유리체강내에 직접 항암제를 투여하는 방법이다 (8). 유리체강내에 항암화학요법은 약물을 직접 안구내로 투여하기 때문에 이러한 문제를 극복 할 수 있다. 몇 년 전만 하더라도 임상적으로 망막모세포종의 전안부 수술은 전이성종양의 위험이 높았기 때문에 중단되었다. 그러나 최근 이러한 치료 기법을 검토하고 이를 안전하게 사용하는 것이 효과적이라는 보고가 나오고 있다 (24). 이러한 상황을 바탕으로 동물실험을 통해서 약물에 내성이 있음을 확인하기 위해 우선 유리체강내로 종양세포를 넣어 동물 모델을 확립하였다. 부모 세포와 Y79/CBP 및 SNUOT-Rb1/CBP를 각각 안구에 주사한 후 종양이 형성된 안구에 carboplatin을 유리체강내에 다시 주사 하였다. 그 결과 부모 세포 동물 모델에 비해 내성 세포의 동물 모델의 종양이 변함 없이 잘 형성되어 가는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 세포 실험 및 동물 실험을 통해 carboplatin 내성 세포는

고농도에서도 저항성을 보이는 것을 확인하였다.

본 연구에서 carboplatin에 내성을 가진 망막모세포종 세포주의 첫 번째 특징으로 세포 증식 속도의 변화를 확인하였다. Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP는 paclitaxel이나 cisplatin에 저항성이 있는 식도암 세포주에서와 같이 부모 세포에 비해 성장 속도가 감소했다 (25, 26). 내성 세포주는 휴면 세포의 존재로 인해 서서히 성장한다는 보고도 있다 (25). Cisplatin과 carboplatin은 직접적인 DNA 손상과 강한 S기 정지를 유도한다는 것이 일반적으로 알려져 있다 (27, 28). 세포 주기가 멈추면 세포는 DNA 복원과 관련된 유전자를 활성화 또는 비활성화하여 재생성을 시작한다 (28). 이전 보고들과 마찬가지로 Y79/CBP 세포와 SNUOT-Rb1/CBP 세포에서 G0/G1 단계의 비율이 Y79와 SNUOT-Rb1보다 높았다. Western blot을 통해 확인한 결과 세포 주기의 G0/G1에 관련된 인자인 cyclin D1, cyclin D3가 부모 세포에 비해 내성 세포에서 감소하는 결과를 확인하였고, cyclin-dependent kinase inhibitor인 p18과 p21의 발현이 부모 세포보다 carboplatin 내성 세포에서 증가하는 결과를 확인하였다. 이것은 아마도 내성 세포는 세포주기를 늦춰 DNA 손상을 복구하고 약물 내성 메커니즘을 활성화시키는 능력을 향상시키기 위함일 것이다 (29, 30). 그리고, G0/G1기 상태에 있는 종양 세포는 S/G2/M기의 종양

세포보다 전이 속도가 높고 항암제에 대한 내성이 더 높음이 앞선 연구에서 보고된 연구가 있다 (31). 이를 바탕으로 본 연구에서 확립한 내성 세포도 비슷한 특성을 가지고 있다고 볼 수 있다.

그리고 또 다른 특징으로 carboplatin 내성 망막모세포종 세포는 다약제내성에 관련된 ATP-binding cassette 전달체(ABC transporter) 유전자 발현과 구리 전달체(copper transporter)의 유전자 발현의 변화가 있음을 확인했다. 이 두 개의 전달체는 세포가 약물 내성을 갖게 하는 중요한 메커니즘으로 가장 잘 알려진 것이다 (32, 33). ATP-binding cassette (ABC) 전달체는 P-glycoprotein 또는 multidrug resistance protein 1 (P-gp; ABCB1/MDR1) 및 multidrug resistance associated protein (ABCC/MRP)을 포함한다. 구리 전달체는 2개의 Cu 유출 전달체인 ATP7A 및 ATP7B는 백금 제제(cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin)의 종양 세포 흡수를 조절한다.

ABC 전달체 발현은 항암화학요법 내성의 주요 인자이다 (34). 이 superfamily의 구성원은 ATP 가수 분해로부터 얻은 에너지를 이용하여 펩타이드, 지질 및 세포막을 가로 지르는 항암제를 포함한 광범위한 기질들을 운반한다 (35). 본 연구에서 Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP가 ABC 전달체와 관련된 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

앞서 언급했듯이, 항암화학요법 내성의 또 다른 이유로는 구리 전달체의 존재 때문이다 (33). 난소암 세포주에서도 ATP7A의 과발현이 cisplatin, carboplatin, oxaliplatin에 대한 내성을 증가시켰다 (36). 다른 보고에서는 난소암 세포주에서 ATP7B 과발현이 carboplatin, cisplatin에 내성을 갖는 것으로 나타났다 (37). 이와 유사하게, 본 연구에서도 carboplatin 내성 망막모세포종 세포주에서 ATP7A와 ATP7B의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이로써 carboplatin에 대한 내성은 이와 관련이 있음을 알 수 있었다.

앞선 결과를 바탕으로 다약제내성과 관련된 유전자의 저해제를 처리하여 실제 부모 세포와 비슷한 효과가 나타나는지 확인하였다. 그 결과 저해제들로 인해 내성 세포주들이 다시 부모 세포로 돌아가게 되는 것을 확인하였다. 이로써, 이전 연구에서 망막모세포종의 치료 반응 중 다약제내성과 관련된 인자의 중요성을 입증 한 바와 같이 (38-40), carboplatin 내성 망막모세포종 세포에서 다약제내성과 관련이 있는 유전자의 상향 조절이 필수적 특성 중 하나인 것으로 간주 된다.

본 연구에서는 시행하지 않았지만 앞으로 해야할 carboplatin에 의한 내성 연구로 몇 가지 메커니즘을 확인할 필요가 있다. 첫 번째 DNA의 잘못된 부분을 복구(mismatch repair, MMR)하는

메커니즘이다. MMR 단백질들은 약물에 의해 생성된 DNA 손상을 검출하게 된다 (41). 이런 MMR은 carboplatin에 의해 DNA의 손상된 부분을 인식 하여 apoptosis 시작에 기여하는 신호를 생성하게 된다. 하지만 이런 회복 기전의 상실로 인해 carboplatin과 같은 약물과 DNA의 잘못된 부분을 인식할 수 없게 된다. 그로 인해 carboplatin의 내성과 관련이 있게 된다 (42). 두 번째로 뉴클레오티드 제거 복구(nucleotide excision repair, NER) 메커니즘 이다. NER은 백금에 기초한 약물에 내성을 중재하는데 중요한 역할을 한다. DNA의 나선형 구조를 변화시키고 복제 및 전사의 메커니즘을 방해하는 손상은 이 경로에 의해 복구된다 (41). 이 NER의 손상으로 인해 내성 세포가 생길 수 있다. 세 번째로 세포질 내에서 벌어지는 carboplatin의 독성을 없애는(detoxification) 메커니즘 또한 연구를 해야할 부분이다. 이 메커니즘은 약물의 효과를 불활성화 시키는 역할, DNA 복구를 강화시키는 역할, 약물로 야기된 산화 스트레스를 감소시키는 역할을 하는 메커니즘이다 (43). 이런 다양한 연구를 통해 carboplatin에 대한 내성 원인을 밝혀 내성을 극복 할 수 있는 치료법이 개발되어야 할 것이다.

Retinoblastoma의 항암 치료에서 carboplatin에 대한 내성은 치료에 주요한 문제이다. 이에 carboplatin 내성을 갖은 망막모세포 세포주인

Y79/CBP와 SNUOT-Rb1/CBP을 사용하여 내성 망막모세포종의 치료
방법을 찾는 데 유용한 도구가 될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Abramson DH, Scheffler AC. Update on retinoblastoma. Retina. 2004;24(6):828-48.
2. Kim H, Lee JW, Kang HJ, Park HJ, Kim YY, Shin HY, et al. Clinical results of chemotherapy based treatment in retinoblastoma patients: a single center experience. Cancer Res Treat. 2008;40(4):164-71.
3. Dimaras H, Corson TW, Cobrinik D, White A, Zhao J, Munier FL, et al. Retinoblastoma. Nat Rev Dis Primers. 2015;1:15021.
4. Hayden BH, Murray TG, Scott IU, Cicciarelli N, Hernandez E, Feuer W, et al. Subconjunctival carboplatin in retinoblastoma: impact of tumor burden and dose schedule. Arch Ophthalmol. 2000;118(11):1549-54.
5. Pochanugool L, Kunavisarut S, Hathirat P, Dangprasert S. The role of radiation therapy in retinoblastoma. J Med Assoc Thai. 1994;77(8):393-9.
6. Schaiquevich P, Fabius AW, Francis JH, Chantada GL, Abramson DH. OCULAR PHARMACOLOGY OF CHEMOTHERAPY FOR RETINOBLASTOMA. Retina. 2017;37(1):1-10.
7. Shields CL, Shields JA. Retinoblastoma management: advances in enucleation, intravenous chemoreduction, and intra-arterial chemotherapy. Curr Opin Ophthalmol. 2010;21(3):203-12.

8. Shields CL, Fulco EM, Arias JD, Alarcon C, Pellegrini M, Rishi P, et al. Retinoblastoma frontiers with intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitreal chemotherapy. *Eye (Lond)*. 2013;27(2):253-64.
9. Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA, Gabriel FG, Whitehouse PA, Sharma S, et al. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2005;5:78.
10. Gobin YP, Dunkel IJ, Marr BP, Brodie SE, Abramson DH. Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma: four-year experience. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(6):732-7.
11. Chawla B, Singh R. Recent advances and challenges in the management of retinoblastoma. *Indian J Ophthalmol*. 2017;65(2):133-9.
12. Mashayekhi A, Shields CL, Eagle RC, Jr., Shields JA. Cavitary changes in retinoblastoma: relationship to chemoresistance. *Ophthalmology*. 2005;112(6):1145-50.
13. Kaliki S, Shields CL, Rojanaporn D, Al-Dahmash S, McLaughlin JP, Shields JA, et al. High-risk retinoblastoma based on international classification of retinoblastoma: analysis of 519 enucleated eyes. *Ophthalmology*. 2013;120(5):997-1003.
14. Shields CL, Bianciotto CG, Jabbour P, Ramasubramanian A, Lally SE, Griffin GC, et al. Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma: report No.

- 1, control of retinal tumors, subretinal seeds, and vitreous seeds. Arch Ophthalmol. 2011;129(11):1399-406.
15. Akita H, Doki Y, Miyata H, Hirao T, Yano M, Takachi K, et al. Clinical significance of the second cycle response to cisplatin-based chemotherapy as preoperative treatment for esophageal squamous cell carcinoma. J Surg Oncol. 2006;93(5):401-9.
16. Stephan H, Boeloeni R, Eggert A, Bornfeld N, Schueler A. Photodynamic therapy in retinoblastoma: effects of verteporfin on retinoblastoma cell lines. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(7):3158-63.
17. Wang YF, Kunda PE, Lin JW, Wang H, Chen XM, Liu QL, et al. Cytokine-induced killer cells co-cultured with complete tumor antigen-loaded dendritic cells, have enhanced selective cytotoxicity on carboplatin-resistant retinoblastoma cells. Oncol Rep. 2013;29(5):1841-50.
18. McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum Neurotoxicity Pharmacogenetics. Mol Cancer Ther. 2009;8(1):10-6.
19. Amptoulach S, Tsavaris N. Neurotoxicity Caused by the Treatment with Platinum Analogues. Chemother Res Pract. 2011;2011:843019.
20. Shi L, Nishioka WK, John Tn, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34{cdc2} Activation Required for Apoptosis. Science. 1994;263(5150):1143-5.

21. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615-27.
22. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Kim DH, Kim CJ, Kim KW. Establishment and characterization of a novel, spontaneously immortalized retinoblastoma cell line with adherent growth. *Int J Oncol.* 2007;31(3):585-92.
23. Jo DH, Lee K, Kim JH, Jun HO, Kim Y, Cho YL, et al. L1 increases adhesion-mediated proliferation and chemoresistance of retinoblastoma. *Oncotarget.* 2017.
24. Manjandavida FP, Shields CL. The role of intravitreal chemotherapy for retinoblastoma. *Indian J Ophthalmol.* 2015;63(2):141-5.
25. Wang C, Guo LB, Ma JY, Li YM, Liu HM. Establishment and characterization of a paclitaxel-resistant human esophageal carcinoma cell line. *Int J Oncol.* 2013;43(5):1607-17.
26. Wen J, Zheng B, Hu Y, Zhang X, Yang H, Luo KJ, et al. Establishment and biological analysis of the EC109/CDDP multidrug-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Oncol Rep.* 2009;22(1):65-71.
27. Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells. *Cell cycle.* 2009;8(18):3039-50.

28. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005;205(2):275-92.
29. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;63(1):12-31.
30. Engelmann D, Putzer BM. Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist Updat.* 2010;13(4-5):119-31.
31. Yano S, Miwa S, Mii S, Hiroshima Y, Uehara F, Yamamoto M, et al. Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell cycle.* 2014;13(6):953-60.
32. Ishikawa Y, Nagai J, Okada Y, Sato K, Yumoto R, Takano M. Function and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured human Y79 retinoblastoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(3):504-511
33. Safaei R, Howell SB. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;53(1):13-23.
34. Jia M, Wei Z, Liu P, Zhao X. Silencing of ABCG2 by MicroRNA-3163 Inhibits Multidrug Resistance in Retinoblastoma Cancer Stem Cells. *J*

Korean Med Sci. 2016;31(6):836-42.

35. Wu CP, S VA. The pharmacological impact of ATP-binding cassette drug transporters on vemurafenib-based therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(2):105-11.
36. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10(14):4661-9.
37. Katano K, Safaei R, Samimi G, Holzer A, Rochdi M, Howell SB. The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 2003;64(2):466-73.
38. Chan HS, Lu Y, Grogan TM, Haddad G, Hipfner DR, Cole SP, et al. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res*. 1997;57(12):2325-30.
39. Chan HS, Thorner PS, Haddad G, Gallie BL. Multidrug-resistant phenotype in retinoblastoma correlates with P-glycoprotein expression. *Ophthalmology*. 1991;98(9):1425-31.
40. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'Graggen K, Volk C, Hoffmann MM, et al. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1,

- MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(6):949-58.
41. Rabik CA, Dolan ME. Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. *Cancer treatment reviews.* 2007;33(1):9-23.
42. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, et al. The Role of DNA Mismatch Repair in Platinum Drug Resistance. *Cancer Research.* 1996;56(21):4881-6.
43. Z.H. Siddik. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22 (2003), pp. 7265-7279

Abstract

Introduction: Local treatment and carboplatin-based chemotherapy are the mainstay treatment option of retinoblastoma, an intraocular malignant tumor in children. Although most patients respond to initial treatment, resistance to chemotherapy can occur to result in additional treatment or enucleation, the total removal of the eyeball. The purpose of this study was to establish carboplatin-resistant retinoblastoma cell lines to facilitate research on the treatment of chemoresistant retinoblastoma.

Methods: Resistant cell lines (Y79/CBP and SNUOT-Rb1/CBP) were developed by slowly increasing the concentration of carboplatin in the media of human retinoblastoma cell lines (Y79 and SNUOT-Rb1). To confirm resistance to carboplatin, cell viability analysis was performed. And DNA fragmentation and cleaved caspase-3 expression were also observed in the resistance cells. Retinoblastoma cells were injected into the vitreous of mice. And then, 2 weeks later, the tumors were injected with carboplatin in the eyeball. We also identified growth curves, cell cycle distribution and cell cycle protein expression in parental and resistant cells. Finally, we observed changes in multidrug resistance gene expression in parental and resistant cells.

Results: Two retinoblastoma cell lines, Y79 and SNUOT-Rb1, were treated with increasing concentrations of carboplatin to develop carboplatin-resistant retinoblastoma cell lines (Y79/CBP and SNUOT-Rb1/CBP, respectively). To verify resistance to carboplatin, the degree of DNA fragmentation and the expression of cleaved caspase-3 were evaluated in retinoblastoma cells upon the treatment with carboplatin. In addition to *in vitro* chemoresistance, newly developed carboplatin-resistant retinoblastoma cells formed *in vivo* intraocular tumors more effectively even with intravitreal injection of carboplatin than their parental cells. Interestingly, the proportion of G0/G1 was increased in Y79/CBP and SNUOT-Rb1/CBP compared to their parental cells. In line with these data, cyclin D1 and cyclin D3 were decreased, while p18 and p27 were increased in carboplatin-resistant cells. In addition, genes related to multidrug resistance were increased.

Conclusions: These carboplatin-resistant cell lines and the development platform might be utilized for studies on chemoresistance in retinoblastoma.

Keywords: Retinoblastoma, Chemoresistance, Carboplatin, Cell cycle, Multidrug resistance

Student number: 2014–30669